



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 44 13 121 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 B 57/00
G 01 N 30/60
B 01 D 15/08
G 01 N 30/48

⑳ Aktenzeichen: P 44 13 121.6
㉑ Anmeldetag: 17. 4. 94
㉒ Offenlegungstag: 16. 2. 95

DE 44 13 121 A 1

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

⑦① Anmelder:
Schurig, Volker, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE

⑦② Erfinder:
Schurig, Volker, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE; Jung,
Martin, Dr., 72076 Tübingen, DE; Jakubetz, Hansjörg,
72076 Tübingen, DE; Negura, Simona, 72076
Tübingen, DE

⑤④ Verfahren zur Enantiomerentrennung an chiralen Stationärphasen durch Flüssigchromatographie in Kapillarsäulen

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Trennung von Enantiomeren durch Flüssigchromatographie in offenen Kapillarsäulen unter Verwendung von chiralen Stationärphasen. Als chirale Komponente wird beispielsweise ein Polysiloxan, an das alkyliertes Cyclodextrin (α , β oder γ) chemisch gebunden wurde (z. B. CHIRALSIL-DEX) und welches auf der Oberfläche der Kapillarinnenwand immobilisiert wurde, verwendet. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur qualitativen und quantitativen Analyse von Enantiomeren. Hierbei besteht keine Beschränkung auf unzersetzt flüchtige Analyte wie in der Kapillar-Gaschromatographie. Ein typischer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der geringe Lösungsmittelverbrauch im Mikroliterbereich, sowie die lange Lebensdauer der verwendeten Anordnung. Die bei Verwendung als Zusatz zur mobilen Phase übliche Notwendigkeit der de-novo-Bereitstellung der chiralen Trennkomponente nach jedem Analysengang erübrigt sich im erfindungsgemäßen Verfahren.

DE 44 13 121 A 1

Die folgenden Angaben sind dem Anmelder eingereicht und entnommen

BUNDESDRUCKEREI 12. 94 408 067/437

7/38

Beschreibung

Die Kapillar-Gaschromatographie zeichnet sich durch hohe Effizienz (geringe Bodenhöhe, HETP), Trennleistung (hohe Auflösung, $R_{1,2}$), geringe Analysenzeiten (kleine Retentionsfaktoren, k) und hohe Detektionsempfindlichkeit aus. Außerdem sind geeignete Kopplungsmethoden verfügbar. Dagegen wird die Flüssigchromatographie fast ausschließlich in Gepacktsäulen unter Anwendung von Druck betrieben. Die universelle Golay-Gleichung, die die maximale Effizienz einer Kapillarsäule (ausgedrückt durch die Höhe eines theoretischen Bodens, HETP) mit der mittleren Flußgeschwindigkeit (v) verknüpft, sagt jedoch voraus, daß die Kapillarflüssigchromatographie (open tubular liquid chromatography, OTLC) eine wichtige Alternative zur Gepacktsäule darstellt (G. Guichon, H. Colin, in P. Kucera (Ed.), "Micro Column High Performance Liquid Chromatography", Elsevier, Amsterdam, (1984)).

Voraussetzung für diese Methode ist jedoch die Verwendung von Säulen mit geringem Innendurchmesser ($\leq 50 \mu\text{m}$), Belegung mit Stationärphasen (z. B. Polysiloxane), die bevorzugt immobilisiert werden, totvolumenarme oder -freie Injektionssysteme (split-Technik) und on-column-Detektion (UV, Laser-induzierte Fluoreszenz). Fortschrittsberichte und Originalpublikationen dokumentieren überzeugend die Anwendbarkeit der OTLC (D. Ishi et al., J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun., 2 (1979) 371; T. Tsuda, G. Nakagawa, J. Chromatogr., 268 (1983) 369; H. Engelhardt, B. Lillig, J. High Res. Chromatogr., Chromatogr. Commun., 8 (1985) 531; O. van Berkel, H. Poppe, J. C. Kraak, Chromatographia, 24 (1987) 739. K. Jinno, Chromatographia, 25 (1988) 1004; S. Folestad, B. Josefsson, M. Larsson, J. Chromatogr., 391 (1987) 347.

Wichtige Vorteile der OTLC sind hohe Effizienz, hohe Permeabilität, einfache Apparaturen, Kopplungsmöglichkeiten aufgrund geringer Flußraten und geringster Verbrauch an ggf. umweltschädlichen und toxischen Lösungsmitteln.

Die Enantiomerentrennung wird in der Flüssigchromatographie ausschließlich mit Gepacktsäulen betrieben. Es sind über 500 chirale Stationärphasen bekannt und die publizierten Daten können nur noch durch Datenbanken (z. B. Chirabase) sinnvoll erfaßt werden. Obwohl immobilisierte chirale Polysiloxane (CHIRASIL-DEX) in der Kapillar-Gas- und Supercriticalfluid-Chromatographie routinemäßig eingesetzt werden, liegen nach unserer Kenntnis überraschenderweise keine Anwendungen dieser Methode in der enantioselektiven OTLC vor.

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung chiraler modifizierter Oberflächen von Kapillarsäulen zur enantioselektiven Flüssigchromatographie wie am Beispiel von immobilisiertem CHIRASIL-DEX (Peralkylierte Cyclodextrine, die über eine Polyalkylidenkette an immobilisierbares Polysiloxan gebunden sind, z. B. Abb. 1) gezeigt wird. Die apparativen Probleme der OTLC werden besonders einfach durch die Verwendung einer Kapillarelektrophoreseanordnung mit dem PRINCE Injektionssystem und on-column-Detektion ohne Spannungsanlegung durchgeführt. Da diese Geräte zunehmend in modernen Laboratorien verfügbar sind, ist mit einer schnellen Verbreitung des erfindungsgemäßen Verfahrens zu rechnen.

Die vorliegende Erfindung grenzt sich von einer vorhergehenden Offenlegung (Deutsche Patentanmeldung

P 41 36 462.7), die die Enantiomerentrennung mit dem gleichen Säulentyp durch Elektromigration in einem elektrokinetischen Verfahren ("Elektrochromatographie") beschreibt, dadurch ab, daß im letzteren Fall die Wanderung der Analyte durch Elektroosmose und/oder Elektrophorese erfolgt, während im vorliegenden Beispiel die Wanderung aufgrund einer angelegten Druckdifferenz zustandekommt.

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Auftrennung von Enantiomeren durch Flüssigchromatographie in Kapillarsäulen, die mit chiralen oberflächen-gebundenen und/oder quervernetzten, immobilisierten enantioselektiven Stationärphasen, z. B. CHIRASIL-DEX (ein Polysiloxan, an das Cyclodextrin chemisch angebunden ist) belegt wurden. Bei diesem Verfahren werden die zu trennenden Enantiomere durch Druckdifferenz durch die Trennkapillare bewegt. Die Aufbringung des Cyclodextrins auf die Oberfläche erfolgt durch vorausgehende chemische Anbindung an ein Polysiloxan und dessen Immobilisierung. Erfindungsgemäß muß die Anbindung jedoch nicht ausschließlich durch vorherige chemische Bindung an ein unlösliches oder immobilisierbares Polymer erfolgen, sondern kann prinzipiell auch durch direkte Reaktion an Silanolgruppen der Oberfläche erfolgen. Die Belegung der Kapillareninnenwand kann auch durch chirale Selektoren erfolgen, die in einem Lösungsmittel (z. B. ein Polysiloxan, Carbowax) gelöst werden, wie in der Gaschromatographie üblich. Um das Auswaschen der ungebundenen Stationärphase zu erschweren, kann die mobile Phase mit dem Lösungsmittel gesättigt werden. Bevorzugt wird jedoch der Einsatz von chiralen Polymeren auf Polysiloxanbasis wie zum Beispiel CHIRASIL-DEX (oder anderen chiralen Polymeren) (V. Schurig, D. Schmalzing, M. Schleimer, Angew. Chem. 103 (1991) 994). In diesen Polymeren ist der chirale Selektor kovalent an das Polymer angebunden. Aufgrund der oft hohen Enantioselektivität verbunden mit den Vorteilen von Polysiloxanen, wie einfaches Belegen von Oberflächen, leichte Immobilisierbarkeit und hohe chemische Stabilität hat sich die chirale Stationärphase CHIRASIL-DEX bewährt wie auch schon in anderen Verfahren, z. B. Gaschromatographie und Superkritische-Fluid-Chromatographie (V. Schurig et al., J. High Resolut. Chromatogr. 13 (1990) 713 und 14 (1991) 58) und Elektrochromatographie (Deutsche Patentanmeldung P 41 36 462.7).

Erfindungsgemäß wird das für die OTLC kritische Problem der Vermeidung von Peakverbreiterungen durch Extra-Säulen-Effekte (Injektion, Detektion) durch Anlehnung an die inzwischen verfügbare Technologie für elektronische Verfahren optimal gelöst. So wurde konnte erstmals mit dem Kapillarelektrophoresesystem der Firma Bischoff (Leonberg) PRINCE eine Enantiomerentrennung mittels Kapillarflüssigkeitschromatographie durchgeführt werden (Abb. 2-4).

PRINCE ist ein automatisches, variables Druckinjektionsgerät für die Kapillarelektrophorese. Durch die Anwendung von kontrollierten Druckrampen in einem geschlossenen System sind die physikalischen Gesetze von Boyle (Druck) und Poiseuille (Strömung) konsequent verwirklicht. Das Gerät erzeugt zuverlässige und genaue Injektionsergebnisse mit einer Fehlerquote unter 1%. So lag es nahe, dieses System für die Kapillarflüssigchromatographie (OTLC) einzusetzen. Probleme,

die bei der HPLC mit Kapillarsäulen auftreten, wie z. B. Totvolumina, bedingt durch Injektionstechnik sowie multiple Verschraubungen, treten hier nicht auf. Des weiteren erzeugt das PRINCE-System einen gegenüber üblichen HPLC-Pumpen impulsfreien Druck, der das System für Kopplungsmethoden (z. B. LC-MS etc.) prädestiniert. Der für die Injektion aufgebaute Überdruck wird für die Wanderung der Enantiomere in der Kapillarsäule nutzbar gemacht.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann jedoch unter größerem Aufwand auch in einer für die OTLC ausgelegten HPLC-Anordnung, wie sie aus der Literatur bekannt ist, betrieben werden.

Vorteile der hier beschriebenen Erfindung gegenüber der konventionellen Gepackt-HPLC für die Enantiomeranalytik sind neben einfacher Handhabung ein geringer Verbrauch an mobiler und stationärer Phase (Kostenfaktor), Verzicht auf Trägermaterial, Zunahme der Massensensitivität für mengen-spezifische Detektoren, hohe Präzision, hohe Effizienz und deshalb bessere Enantiomeren-Auflösung, einfache Kopplung (hyphenated techniques) mit spektroskopischen (LC-MS, LC-FTIR) und sekundären chromatographischen Systemen aufgrund geringerer Flußraten. In multidimensionaler Anordnung lassen sich Kapillarsäulen einfacher in Serie oder hintereinander schalten. Aufgrund des geringen Säulenvolumens ist die Wärmekapazität des Systems gering und die Kapillarsäulen eignen sich besonders für die Temperaturprogrammierung.

Eine erfindungsgemäße Variante ist die Beimischung des chiralen Selektors in die Mobilphase und Trennung der Enantiomere durch OTLC an einer achiralen Stationärphase (z. B. Polysiloxan) bzw. die Kombination beider Methoden (chirale Stationärphase und chirale mobile Phase).

Die folgenden Beispiele sollen das erfindungsgemäße Verfahren erläutern, ohne dieses jedoch einzuschränken.

Beispiele

Beispiel 1: Instrumentelle Parameter der Kapillarflüssigchromatographie (OTLC)

Es wurde ein Kapillarelektrophoresegerät der Firma Bischoff (Leonberg) PRINCE verwendet, ausgestattet mit einem on-column UV-Detektor. Die Injektion erfolgte durch dynamische Druckinjektion (PRINCE-System). Alle Proben wurden in Methanol gelöst und auf eine Konzentration von 0,1 mg in 1 ml eingestellt. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Bevor die Säulen in das Gerät eingebaut wurden, wurde 17 cm vor dem Säulende durch Abbrennen von etwa 3 mm Polyimidschicht mit schwacher Flamme das optische Fenster für die on-column UV-Detektion angebracht. Die Säulenlängen wurden so gewählt, daß die effektive Länge 80 cm (vom Injektor zum optischen Fenster) betrug. Der für die Messung benötigte Druck wurde mittels des "PRINCE-Systems" erzeugt. Die Chromatogramme wurden mit einem Integrator CR-6A der Firma Shimadzu aufgezeichnet.

Beispiel 2: Herstellung der Kapillarsäulen

Es wurden 1 m Fused silica Kapillarsäulen der Firma Ziemer (Mannheim) mit einem Innendurchmesser von 50 µm verwendet. Vor dem Belegen wurden die Säulen bei schwachem Wasserstoffstrom zwei Stunden lang bei

250°C dehydratisiert. Die Anbindung der Cyclodextrinderivate an das Polysiloxan erfolgt durch Hydrosilylierung (V. Schurig et al., J. High Resolut. Chromatogr. 13 (1990) 713 und 14 (1991) 58). Die Säulen wurden mit sorgfältig filtrierten 2,0% (w/v) Lösungen von Chirasil-Dex in Diethylether bei 30°C und 0,01 Torr statisch belegt, so daß sich eine Filmdicke von ca. 0,25 µm ergab. Anschließend wurden die Kapillaren zwölf Stunden bei 0,5 bar Wasserstoff und 100°C konditioniert.

Beispiel 3: Immobilisierung

Die Immobilisierung wurde durch Einbau der Kapillarsäulen in Gaschromatographen der Firma Carlo Erba (Fisons, Mainz) der Typen Fractovap 2101, 2150, 2350 und Vega durchgeführt. Diese waren mit Split-Injektor (1 : 100) und Flammenionisationsdetektor (FID) versehen. Als Trägergas wurde Wasserstoff (Reinheit 99,999%) und Druckluft verwendet.

Zur thermischen Immobilisierung von mit Chirasil-Dex belegten Kapillarsäulen wurden diese am Injektor an den Gaschromatographen eingebaut und 24 Stunden bei einem äußerst geringen Wasserstofffluß (etwa 30 Blasen pro Minute am Säulende, bei geöffnetem Split) auf 190°C erhitzt. Zur Berechnung des Immobilisierungsgrades wurden Testchromatogramme (n-Decan-, n-Tridecan und 1-Phenylethanol) nach der Immobilisierung und nach dem Auswaschen der Kapillaren mit 5 ml Methanol, einem Gemisch aus Methanol/Dichlormethan (1 : 1) und 5 ml Dichlormethan aufgenommen. Aus der prozentualen Abnahme der k-Werte für die n-Alkane nach der Immobilisierung und nach dem Auswaschen wurde der Immobilisierungsgrad (meist 80%) berechnet.

Beispiel 4: Herstellung der Puffer

Alle Puffer wurden mit Wasser für die HPLC hergestellt, im Kühlschrank gelagert und vor Einsatz in der LC mit einem Filter (0,45 µm Porengröße) (Machery Nagel, Düren) gefiltert. Zur Herstellung des Borat/Phosphat Puffers wurden jeweils Lösungen aus $\text{NaH}_2\text{P}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ in der Konzentration von 20 mM bereitet und auf pH 7 durch Mischen der Lösungen gleicher Konzentration eingestellt. Je nach Bedarf wurde dem Puffer Methanol für die HPLC beigelegt.

Beispiel 5: Enantiomerentrennungen (Abb. 2—4)

Die Kapillarsäule wird in das Kapillarelektrophoressystem der Firma Bischoff (Leonberg) PRINCE eingebaut.

Auf vorsichtige Justierung des Injektionsfensters wird geachtet. Die Kapillarsäule wird mit Pufferlösung (z. B. Borat-Phosphat Puffer pH 7) langsam gespült. Diese Spülung wird solange durchgeführt, bis sich bei sehr empfindlicher Einstellung des Detektors und des Integrators (z. B. Shimadzu CR-6A Chromatopac) eine stabile Basislinie zu beobachten ist.

Nach Beispiel 2 wurde eine Kapillarsäule belegt und die chirale stationäre Phase CHIRASIL-DEX nach Beispiel 3 immobilisiert. Mit dieser Kapillarsäule gelang die Enantiomerentrennung von Hexobarbital, Methylphenobarbital und Thiamylal (Abb. 2—4).

Folgende Parameter sind für alle drei Trennungen gültig:

Injektion: 60 mbar, 0,12 min;
Säuleninnendurchmesser: 50 μm ;
effektive Säulenlänge bis zum Detektor: 80 cm;
totale Länge 97 cm;
es wird ein Borat-Phosphat Puffer pH 7 verwendet, der
mit Methanol versetzt wurde (Puffer-Methanol 80/20
(v/v));
Detektion 220 nm.

Die Enantiomerentrennung von Hexobarbital wird
mit einem Druck von 0,5 bar, die von Methylphenobar-
bital und Thiamylal bei 1 bar durchgeführt. Die Säule
wird nach jeder Messung 0,5 min bei 2 bar mit Methanol
und anschließend 0,5 min bei 2 bar mit dem entspre-
chenden Puffer gespült.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von Enantiomeren
durch Flüssigchromatographie in Kapillarsäulen,
dadurch gekennzeichnet, daß chirale Stationärph-
asen verwendet werden, die als Film auf die Innen-
oberflächen der Kapillare aufgebracht werden.
2. Verfahren zur Trennung von Enantiomeren
durch Flüssigchromatographie in Kapillarsäulen,
dadurch gekennzeichnet, daß chirale Stationärph-
asen verwendet werden, die als Film auf die Innen-
oberfläche der Kapillare aufgebracht werden und
anschließend immobilisiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch ge-
kennzeichnet, daß immobilisiertes CHIRASIL-
DEX zur Oberflächenmodifizierung eingesetzt
wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch
gekennzeichnet, daß die Hydroxylgruppen der Cy-
clodextrinkomponente im CHIRASIL-DEX frei
oder alkyliert (unverzweigt, verzweigt bis C_{100})
oder acyliert oder perfluoroacyliert (unverzweigt,
verzweigt bis C_{100}) vorliegen und daß α , β , γ oder
 δ -Cyclodextrin eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch
gekennzeichnet, daß die Anbindung der Cyclodex-
trinkomponente an das Polysiloxan in CHIRASIL-
DEX über eine verzweigte oder unverzweigte Al-
kylidenkette beliebiger Länge erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch
gekennzeichnet, daß die Polysiloxankomponente in
CHIRASIL-DEX, deren organische Reste alle bis-
her bekannten Radikale (Alkyle, Aryle, funktionali-
siert oder unfunktionalisiert) darstellen können, auf
Kapillaroberflächen (bevorzugt Fused Silica) im-
mobilisiert wird.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

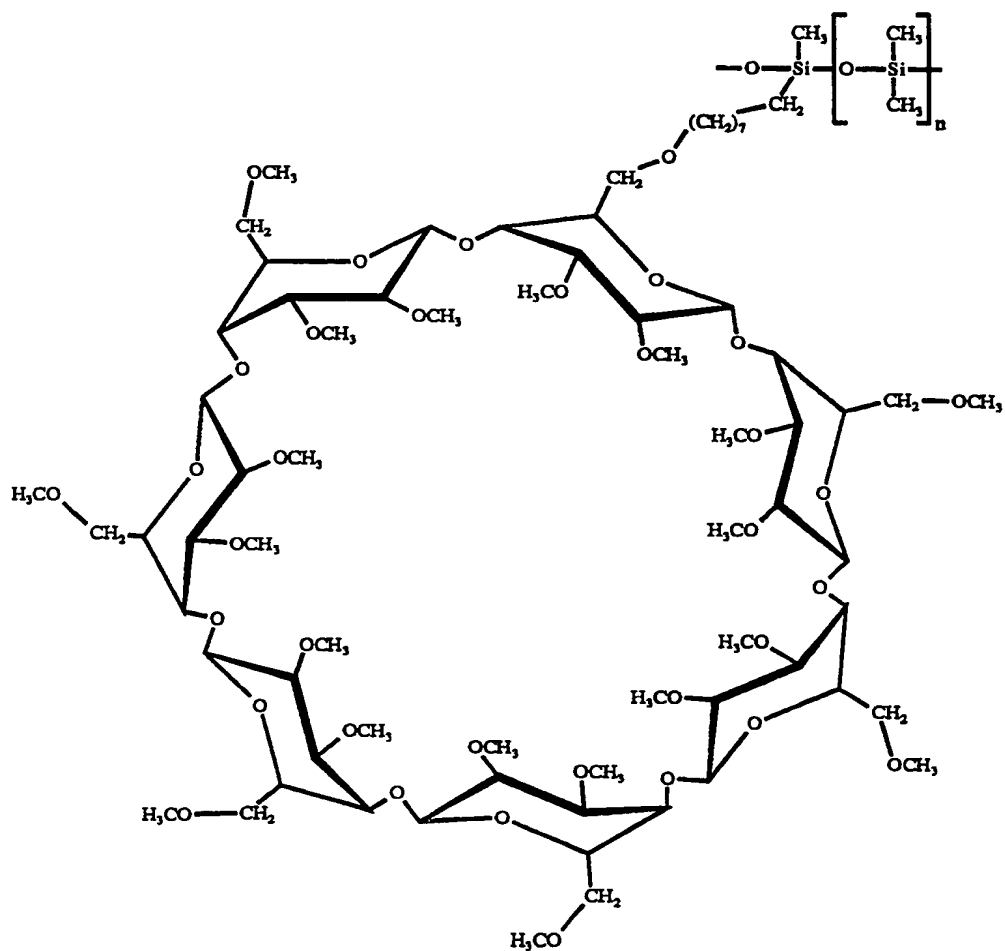


Fig 1

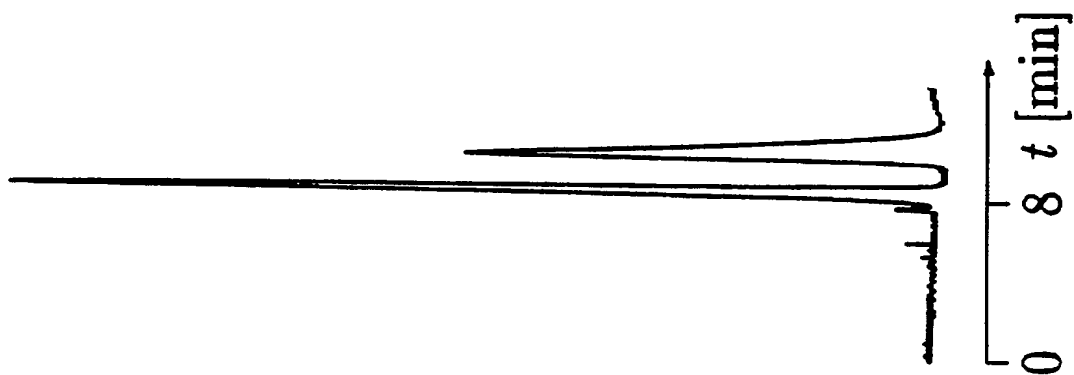
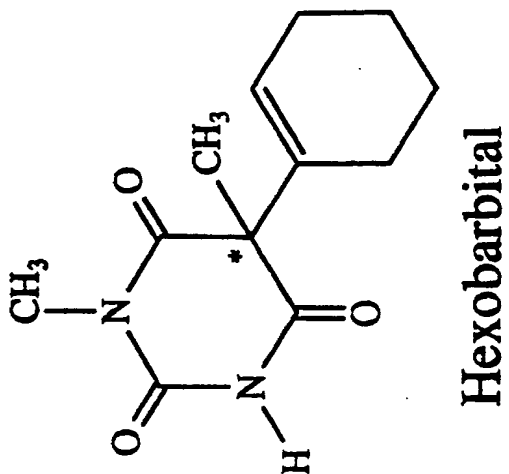
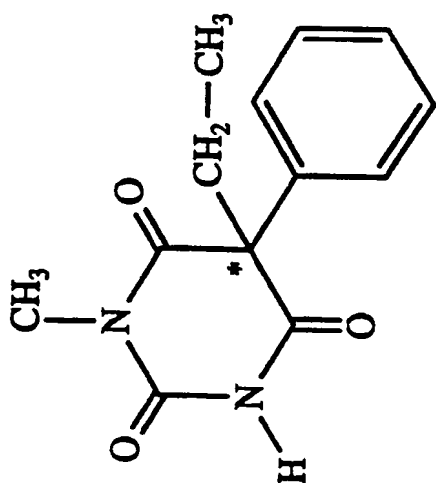
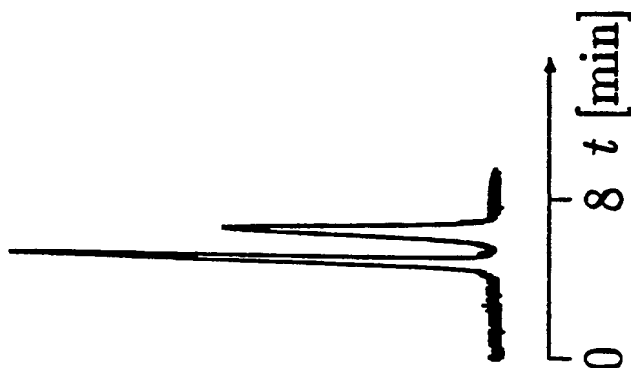


Abb. 2

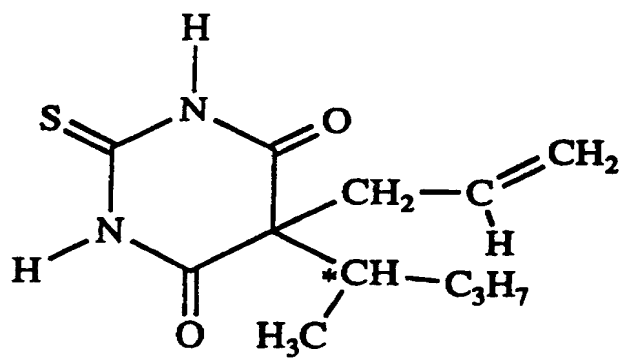


Methylphenobarbital



Dib. 3

756 4



Thiamylal

